

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin im Klinikum Westend
Direktor: Professor Dr. med. Günter A. Neuhaus

Untersuchungen über die Bindung von Digitoxin an die Serumeiweißkörper

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabine Krebs, geb. Kropp

aus Frankfurt/O

1971

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin im Klinikum Westend
Direktor: Professor Dr. med. Günter A. Neuhaus

Untersuchungen über die Bindung von Digitoxin an die Serumeiweißkörper

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabine Krebs, geb. Kropp

aus Frankfurt/O

Referent: Professor Dr. med. Antonio Ruiz-Torres

Korreferent: Professor Dr. med. Norbert Rietbrock

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. September 1971



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Fragestellung	4
III. Methodik:	5
1. Angewandte Substanzen	5
2. Aufbereitung der Substanzen	5
3. Radioaktive Messungen	6
4. Papierelektrophorese	7
5. Bestimmung des Proteingehaltes	7
6. Versuchsanordnung	7
7. Beständigkeit der Lösung von Digitoxin in Sörensenpuffer	7
8. Ausschluß der Adsorption von Digitoxin an die semipermeable Membran	9
9. Gleichgewichtseinstellung bei der Dialyse	10
10. Nachweis der Bindung von Digi- toxin an Serumalbumin mittels der Elektrophorese	11
11. Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin in:	11
A. 3 %ige Albuminlösung	11
B. 1,2 %ige und 9 %ige γ -Globulinlösungen	12
12. Bindungskapazität von Digitoxin an Serumalbumin	13
13. Beeinflussung der Bindung von Digitoxin an Serumalbumin durch strukturähnliche Pharmaka	14
14. Fehlerbreite der Methodik	15
IV. Ergebnisse	16
V. Diskussion der Ergebnisse	27
VI. Zusammenfassung	31
VII. Literaturverzeichnis	32



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548824_0046

I. Einleitung

Die Eiweißbindung von körpereigenen und körperfremden Substanzen als wichtiges Kriterium für die Transportvorgänge im Organismus ist erst verhältnismäßig spät in die physiologischen Überlegungen einbezogen worden. BENNHOLD 1938 wies auf Grund eigener Untersuchungen auf die Wichtigkeit dieser Transportvorgänge und der damit verbundenen Eiweißbindung körpereigener und körperfremder Substanzen hin. (6, 7, 8, 9)

Die ersten Untersuchungen über das unterschiedliche Verhalten von Herzglykosiden liegen bereits 60 Jahre zurück. 1913 fand OPPENHEIMER (48), daß beim Zusatz von Serum zum Glykosid trotz letaler Dosis der systolische Herzstillstand beim Froschherzen nicht eintrat. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen von LHOTAK VON LHOTA 1913 (37, 38). HOEKSTRA zeigte 1931 (28, 29), daß die Hemmung der Glykosidwirkung durch Eiweißzusatz nach der Denaturierung nicht auftrat.

LENDL und PUSCH (39, 50) verwandten 1935 den kolorimetrischen Nachweis mit alkalischer Pikrinsäure (Baljet'sche Reaktion) zur Bestimmung der Herzglykosidkonzentration und beobachteten die Wirkung der Digitalisstoffe am isolierten Froschherzen. Die kataphoretische Untersuchung dieser Autoren konnte keine eindeutige Bindung der Digitaliskörper an bestimmte Fraktionen der Serumeiweiße feststellen. Bei der Ultrafiltration wurde allerdings eine Bindung des Digitoxins an die Eiweißkörper des Serums gefunden. DYBING und HOLZHAUSEN (17) bestätigten 1941 durch die Austauschdialyse mit Zellophanschläuchen und mithilfe der Bestimmung des nicht gebundenen Glykosidanteils mit der Baljet'schen Farbreaktion die früher beschriebene Bindung der Digitalisglykoside an das Serumeiweiß. 1940 erbrachten die Untersuchungen von HAARMANN, HAGEMEIERS und LENDL (26, 27) mittels der Austauschdialyse und stufenphotometrischen Bestimmung der Glykoside, daß die Bindung nur an die Albuminfraktion des Serums erfolgt. Pseudo- und Euglobuline zeigten praktisch kein

Bindungsvermögen. Rechnerische Überlegungen erbrachten, daß pro 1 g Albumin bis zu 9 mg Digitoxin gebunden werden können. ROTHLIN und BIRCHNER (59, 60, 61, 62) kamen auch 1954 zu dem Ergebnis, daß die Albuminfraktion des Blutes ausschließlich für die Bindung des Glykosids verantwortlich ist. Ihre Untersuchungen ergaben aber, daß 1 g Albumin nur 2,23 mg Lanatosid A bzw. Digitoxin zu binden vermag. SPRATT und OKITA (75) verwandten bei ihren Untersuchungen 1958 ^{14}C - und ^3H -markiertes Digitoxin. Bei ihren elektrophoretischen Untersuchungen konnten sie keine Bindung des Digitoxins an Serumalbumin nachweisen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei dem radioaktiv markierten Glykosid mit einem Liquid Scintillation Spectrometer, bei den nicht aktiven mit der Methode der Raimondschen Reaktion modifiziert nach Andersen und Chen. SCHOLTAN und Mitarbeiter (70) konnten unter Verwendung ihres Dialyseverfahrens 1966 zeigen, daß Digitoxin nicht nur von den Albuminen, sondern auch in geringem Maße von den γ -Globulinen gebunden werden kann. KUSCHINSKY (34) bestimmte 1968 die Eiweißbindung verschiedener Herzglykoside mittels der Sephadex-Gelfiltration. Er fand dabei, daß die prozentuale Bindung der Herzglykoside an Eiweiß von ihrem lipophilen Charakter abhängig ist. Er bestimmte, daß 90 % des ^3H -markierten Digitoxins - inkubiert mit Meerschweinchen - oder Humanserum - an das Protein gebunden werden kann. Die Werte für Digoxin lagen bei 55 %, für Strophanthin konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Unveröffentlichte Untersuchungen von RUIZ-TORRES lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Bindung von Digitoxin ausschließlich an die Albuminfraktion erfolgt. Die im γ -Globulinbereich nachgewiesene Menge könnte als "Schwanzbildung" des während der Elektrophorese langsam aus dem Albumin freigesetzten Digitoxins interpretiert werden.

Als Ursache des Bindungsvermögens der Eiweißkörper untereinander und mit Pharmaka ergeben sich auf Grund ihrer physikalisch-chemischen Struktur 4 verschiedene Möglichkeiten:

1. die festen Bindungen (Peptidbindungen und die Ausbildung von Disulfidbrücken, die chemisch eine molekulare Bindung darstellen)
2. Auf Grund des Aufbaus der Proteine mit CO- und NH-Gruppen ist ebenfalls eine Bindung der Eiweißkörper durch "hydrogen bounds" (Wasserstoffbrücken) möglich. Diese beiden Bindungsmöglichkeiten kommen allerdings nur für die Eiweißkörper untereinander in Betracht.
3. Andererseits ist auf Grund der Carboxyl- und der Amino-gruppen, die beide polaren Charakter tragen, auch eine ionogene Bindung mit anderen Substanzen möglich.
4. Die Bindung der Proteine mit Pharmaka kann auch im Sinne einer apolaren Bindung erfolgen. Diese Bindungsart wird auch als hydrophobe Bindung bezeichnet, wobei die hydrophobe Gruppe der Pharmaka an die hydrophobe Gruppe der Peptide durch die London- van der Waalschen Kräfte eine schwache Anziehung erfährt.

SCHOLTAN (66, 67, 68, 69, 70, 71, 72) wies in seinen Arbeiten über die Bindungsmöglichkeiten von Eiweißkörpern besonders auf diese hydrophobe Bindung hin. Er konnte feststellen, daß bei Sulfonamiden durch die Einführung hydrophober Gruppen die Eiweißbindung stark zunahm. Da die Digitaliskörper und auch die Steroidhormone auf Grund ihrer chemischen Struktur eine große Anzahl an hydrophoben Gruppen besitzen, dürfte die Bindungsfähigkeit der Eiweißkörper von Digitalisglykosiden ebenfalls durch die hydrophobe Bindung bedingt sein. Da Strophantin auf Grund seiner chemischen Konstitution mehr Hydroxylgruppen und somit einen stärkeren hydrophilen Charakter besitzt, könnte damit auch die unterschiedliche Bindungsfähigkeit der Eiweißkörper für Digitoxin und Strophantin erklärt werden. SCHOLTAN (70) stellte außerdem fest, daß die Digitalisgenine eine höhere Eiweißbindung besitzen als die Herzglykoside, da durch die Einführung der Zuckerreste es wiederum zum verstärkten hydrophilen Charakter der Substanz kommt. Die Eiweißbindung für die Digitaliskörper dürfte also hauptsächlich durch die hydrophobe Bindung hervorgerufen werden.

II. Fragestellung

Bei der Betrachtung der vorliegenden Versuchsergebnisse der einzelnen Autoren sind aber sich widersprechende, teilweise auch ungenaue Angaben über die Bindungsfähigkeit von Digitoxin an die Serumeiweißkörper festzustellen. Darüber hinaus liegen Angaben über die Bindungskapazität der Serumeiweißkörper gegenüber Digitoxin kaum vor.

Diese Arbeit sollte sich mit den folgenden Problemen beschäftigen:

1. Welche Fraktion der Serumeiweiße vermag in angenähert physiologischem Milieu Digitoxin zu binden?
2. Bestimmung der Bindungskapazität des Serumeiweißkörpers, der für die Bindung des Digitoxins verantwortlich ist.
3. Bindungsgeschwindigkeit und Bindungsvermögen in Abhängigkeit von der Konzentration des Glykosids.
4. Können strukturähnliche Pharmaka die Bindung von Digitoxin an die Serumeiweißkörper beeinflussen?
5. Tritt eine Änderung der Bindungsgeschwindigkeit (= Affinität) durch strukturähnliche Substanzen ein?

III. Methodik

1. Angewandte Substanzen

- a) ^3H -markiertes Digitoxin der Firma NEN (New England Nuclear) Chemicals GmbH, Boston, Mass. USA
0,25 mC entsprechend 0,0333 mg ^3H -Digitoxin gelöst
in 0,5 ml 90 % Äthanol-Benzol
Reinheitsgrad 98
Spezifische Aktivität: 5,747 mC/mMol
Lot.-No. 184-143
- b) Digitoxin der Firma Merck AG, Darmstadt
Charge: 70095141, 9016925, 5110503
- c) Digoxin krist. der Firma Merck AG, Darmstadt
Charge: 410129
- d) Prednisolon - soluble BASTIAN Amp.
Bastian-Werk, München-Pasing
Charge: 60028
- e) Human-Albumin
trocken, "reinst", elektrophoretischer Reinheits-
grad 100 %
der Firma Behringwerke AG, Marburg/Lahn
Op.-Nr. 2936, 2985
- f) γ -Globulin
trocken, "reinst", elektrophoretischer Reinheits-
grad 100 %
der Firma Behringwerke AG, Marburg/Lahn
Op.-Nr. 4859
- g) Dialysierschlauch, Durchmesser 22 mm
der Firma Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich

2. Aufbereitung der Substanzen

- a) ^3H -markiertes Digitoxin
Die Digitoxinampulle der Firma NEN wurde im Vakuum-
exsikkator durch Trocknung eingeengt und danach mit
2,2 mg Citronensäure, 7,5 mg Na_2HPO_4 , 0,4 ml Propy-
lenglycol und 0,2 ml 80 %igem Äthanol versetzt und
auf 1,0 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

b) Digitoxin

Wegen der schlechten Löslichkeit des Glykosids in Sörensenpuffer wurde zuerst das inaktive Digitoxin in 25 ml absoluten Alkohol gelöst. Um unter gleichen Versuchsbedingungen arbeiten zu können, erfolgten die Untersuchungen bei gleichen Alkoholkonzentrationen sowohl im Innen- als auch im Außenmedium.

c) Digoxin

0,5 mg Digoxin wurden in 0,3 ml absoluten Alkohol, 0,8 ml Propylenglycol, 1,2 mg Citronensäure und 4,4 mg Na_2HPO_4 gelöst und auf 2,0 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

d) Sörensen-Pufferlösung (pH 7,2)

Lösung A: 9,078 g KH_2PO_4 ad 1,0 l Aqua. destillata.

Lösung B: 11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 1,0 l Aqua dest.

280 ml der Lösung A und 720 ml der Lösung B = 1,0 l Puffer.

Die genaue Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 erfolgte mit dem pH-Meter (350 KNICK).

3. Radioaktive Messungen

Die Bestimmung der Radioaktivität des ^3H -Digitoxins erfolgte in einem Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3324. Die Scintillationsflüssigkeit bestand aus einem Gemisch von 28 g PPO (2,5-diphenyloxazol Packard, 0,35 g POPOP [1,4- bis 2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol] Packard, 840 g Naphthalin auf 7,0 l mit Dioxan aufgefüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden bei nichteiweißhaltigem Milieu mit 1,0 ml Aqua dest. und 10,0 ml Scintillator, die eiweißhaltigen Proben mit 0,45 ml Zephirol^R gelöst in 20 %igem Dioxan, 2,0 ml Aqua dest. und 10,0 ml Scintillator aufgenommen. Da die Zephirollösung eine Herabsetzung der Ausbeute um 46,68 % hervorrief, mußte eine Korrektur erfolgen. Die Zählausbeute lag für ^3H im allgemeinen bei 30 %.

4. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch nach der Buiret-Methode (Messung am Elco II, Filter S 53 E, Küvette 1 cm) und Anfertigung einer Eichkurve.

5. Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese wurde mit Streifen von 7 x 3,5 cm durchgeführt: 0,02 ml Proteinlösung trugen wir auf einen Streifen auf und dieser wurde dann durch die Pufferlösung (60,5 g Veronal - Na auf 5,0 l H₂O) gezogen. Nach zehnstündiger Laufzeit bei 3,25 mA pro Streifen, Trocknung und Färbung. Sie erfolgte 5 min. lang mit einer Bromphenolblaulösung (10 g Bromphenolblau, 320 g Sublimat auf 1 l CH₃OH). Die Streifen wurden anschließend farblos gewaschen: in Entwickler I (10 g Sublimat auf 1 l CH₃OH), 2x in Entwickler II (10 g Sublimat auf 1 l C₂H₅OH) und 2x in Entwickler III (Methanol).

Um eine Denaturierung des Albumins bzw. γ -Globulins durch die relativ lange Dialysedauer ausschließen zu können, erfolgte stets am Ende des Versuchs die Papierelektrophorese aus dem Inhalt des Dialyses Schlauches.

6. Versuchsanordnung

Als Außenmedium für die Dialyseversuche wurden in einem Becherglas 500,0 ml Sörensenpuffer pH 7,2 verwandt. In dieses Gefäß wurde der Cellophanschlauch, der 10,0 ml einer bestimmten Proteinlösung enthielt, eingehängt. Dieses System wurde während der gesamten Versuchsdauer unter stetigem Rühren mit einem Magnetrührer, der sich im Außenmedium befand, im Kühlschrank aufbewahrt.

7. Bestimmung der Beständigkeit der Lösung von Digitoxin in Sörensenpuffer pH 7,2

Das ³H-markierte Digitoxin, das für die Versuche verwendet werden sollte, wurde in diesem Versuch auf sei-

ne Beständigkeit in angenähert physiologischem pH-Bereich geprüft. Da die HWZ von Tritium bei 12,26 Jahren liegt, konnte auf eine Bestimmung der Aktivitätsabnahme des ungelösten ^3H -Digitoxins wegen der relativ geringen Versuchsdauer im Vergleich zur HWZ des Tritiums verzichtet werden.

Zu 500 ml Sörensenpufferlösung von einem konstanten pH-Wert von 7,2 wurden insgesamt 500 μg Digitoxin gelöst. Die Digitoxinmenge setzte sich aus 0,4 μg entsprechend 3 μC ^3H -Digitoxin und 499,6 μg inaktivem Digitoxin zusammen. Die Endkonzentration betrug also 1 μg Digitoxin pro ml Lösung. Ein optisch sichtbares Ausfallen von Digitoxin aus der Sörensenpufferlösung direkt nach Zugabe konnte nicht beobachtet werden. Unter stetigem Rühren mittels eines Magnetrührers wurde die Lösung insgesamt 48 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 4°C (Kühlschranktemperatur) und bei 20°C (Zimmertemperatur) aufbewahrt. Es wurden unmittelbar nach Digitoxinzugabe in die Lösung, nach 8, 24 und 48 Stunden aliquote Mengen zur Aktivitätsbestimmung entnommen. Die einzelnen Proben wurden nach der üblichen Weise im Packard Tri-carb Scintillation Spectrometer auf ihre Aktivität untersucht. Die so erhaltenen Werte in cpm/0,1 ml wurden in μg Digitoxin/ml umgerechnet und linear in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

Die Ergebnisse ($n = 4$) erbrachten sowohl bei 4°C (Kühlschranktemperatur) als auch bei 20°C (Zimmertemperatur) eine gleichbleibende Aktivitätskonzentration der Lösung über die gesamte Untersuchungsdauer (Abb. 1). Die Lösung von Digitoxin in Sörensenpuffer war über den Zeitraum des Versuchs stabil. Es konnte somit ein Ausfallen von Digitoxin aus der Sörensenpufferlösung ausgeschlossen werden.

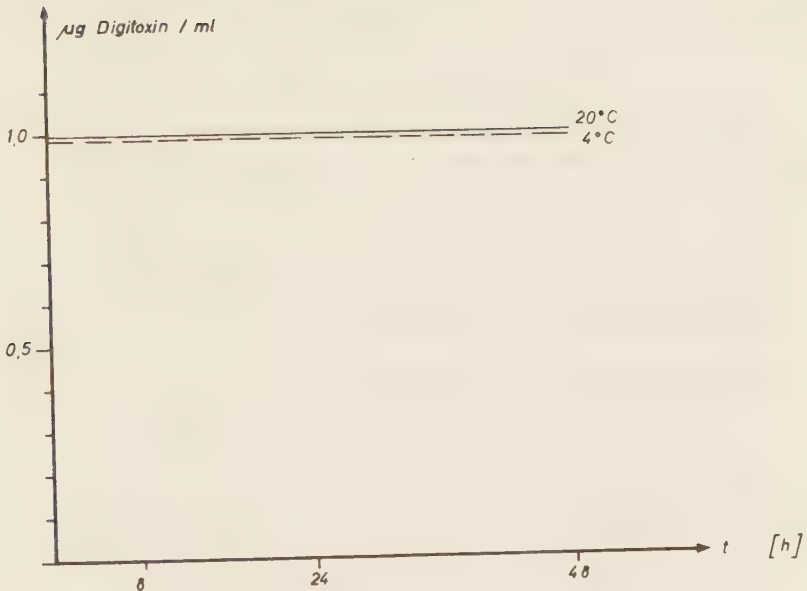


Abb. 1

Bestimmung der Beständigkeit der Lösung von Digitoxin in Sörensenpuffer pH 7,2 bei 4°C und bei 20°C .

8. Ausschluß der Adsorption von Digitoxin an die semi-permeable Membran während der Dialyse

500 ml Sörensenpufferlösung vom pH-Wert 7,2 mit einer Digitoxinkonzentration von $5 \mu\text{g Digitoxin/ml}$ wurden mit Plättchen (Durchmesser 1,5 cm) aus dem Dialyseschlauch 167 Stunden belassen. Sofort nach Zugabe von Digitoxin, nach 48 und nach 167 Stunden erfolgte die Entnahme von Aliquoten zur Aktivitätsmessung.

Falls eine Adsorption an die Membran stattgefunden hätte, wäre bei bekannter Aktivitätskonzentration zu Beginn des

Versuchs die nach 48 und nach 167 Stunden festgestellte Aktivitätsverminderung als die Menge anzusehen, die sich an die semipermeable Wand gebunden hätte.

Die Ergebnisse der radioaktiven Messungen der Aliquote sofort nach Zugabe von Digitoxin zu der Lösung, von 48 und von 167 Stunden zeigten jedoch eine Konstanz ihrer Werte. Es liegt also der Schluß nahe, daß keine oder nur eine zu vernachlässigende Menge von Glykosid an die semipermeable Wand gebunden wird. Auf eine gleichzeitige Mitbestimmung der Adsorptionsgröße konnte daher in allen folgenden Versuchen verzichtet werden.

9. Gleichgewichtseinstellung bei der Dialyse

In diesem Versuch sollte die Geschwindigkeit des Konzentrationsausgleiches von Digitoxin durch die semipermeable Membran bestimmt werden.

In ein Becherglas enthaltend in 500 ml Sörensenpufferlösung 500 µg Digitoxin (0,4 µg entsprechend 3 µC ³H-Digitoxin, 499,6 µg inaktives Digitoxin) wurde ein Dialyseschlauch aus Zellophan, der 10 ml Sörensenpufferlösung vom pH-Wert 7,2 enthält, eingehängt. Die Dialyse wurde nun über 96 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 4° C (Kühlschranktemperatur) und bei einer konstanten Temperatur von 20° C (Zimmertemperatur) durchgeführt (n = 4).

Zur Bestimmung der Aktivität im Außen- und Innenmedium wurden jeweils Aliquote unmittelbar nach der Digitoxinzugabe, nach 6, 12, 24, 48, 72 und nach 96 Stunden entnommen. Anschließend wurde die Aktivität dieser Aliquote im Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer bestimmt. Die ermittelten Werte dieses Versuchs der Innen- und Außenkonzentrationen bei 4° C und bei 20° C wurden in µg Digitoxin/ml umgerechnet und graphisch gegenüber der Zeit aufgetragen.

Der Schnittpunkt der Kurve der Konzentrationen des Außenmediums mit der Kurve der Konzentrationen des Innenmediums zeigt den Zeitpunkt des Konzentrationsausgleiches auf. Er betrug bei dieser Versuchsanordnung bei 4° C

48 Stunden und verkürzte sich bei 20° C um 24 Stunden.

10. Nachweis der Bindung von Digitoxin an Serumalbumin mittels der Elektrophorese

Dieser Versuch sollte den Nachweis erbringen, inwieweit und an welche Fraktionen des Humanserums das Digitoxin bei in vitro-Inkubationen gebunden wird.

2,5 ml Serum gesunder Versuchspersonen wurde mit einer Gesamtmenge von 187,5 µg Digitoxin entsprechend einer Konzentration von 75 µg/ml 48 Stunden lang inkubiert. Die Digitoxinmenge setzte sich aus 5,32 µg (entsprechend 40 µC) ³H-Digitoxin und 182,18 µg inaktives Digitoxin zusammen. Die Molarität der Lösung lag bei 98,0 µMol/l.

Parallele Inkubationen erfolgten unter gleichzeitigem Zusatz von inaktivem Digoxin. Die Konzentration dieses inaktiven Glykosids lag ebenfalls wie beim Digitoxin bei 75 µg/ml entsprechend einer Molarität von 96,0 µMol/l. Am Ende der Inkubation (nach 48 Stunden) wurden Papier-elektrophoresen aus beiden Versuchsansätzen angefertigt, die sowohl für die Färbung als auch für den Aktivitäts-nachweis des radioaktiv markierten Digitoxins im Dünnschicht-Scanner (Berthold) verwandt wurden.

11. Prüfung der Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin in ein eiweißhaltiges Medium

Hierbei sollte in Abänderung des Versuches No. 9 die Geschwindigkeit des Eindringens von Digitoxin in ein eiweißhaltiges Medium bestimmt werden. Als Kriterium für die Penetrationsgeschwindigkeit wurde die Gesamtdigitoxinmenge - bezogen auf mg Protein - in der Zeiteinheit gewählt.

A. 3 %ige Albuminlösung

Bei gleicher Versuchsanordnung wie im oben erwähnten Versuch enthielt jedoch der Dialyseschlauch 10 ml einer 3 %igen Albuminlösung in Sörensenpuffer. Eine 3 %ige Albuminlösung wurde deshalb gewählt, um in einem angenähert physiologischen Bereich zu arbeiten. Um die Ausbildung eines Membranpo-

tentials nach der Donnan-Verteilung zu vermeiden, wurde im Innenmedium ebenfalls Sörensenpuffer verwandt, da das Membranpotential die Diffusionsgeschwindigkeit hätte beeinflussen können. Der Versuch wurde mit jeweils unterschiedlichen Digitoxinkonzentrationen ($5 \mu\text{g}$ Digitoxin/ml, $20 \mu\text{g}$ Digitoxin/ml und $50 \mu\text{g}$ Digitoxin/ml) bei 4°C (Kühlschrantemperatur) durchgeführt. Die Temperatur von 4°C wurde gewählt, um einer Denaturierung des Albumins auf Grund der relativ langen Versuchsdauer entgegenzuwirken. Die Radioaktivität betrug bei allen Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Digitoxinendkonzentrationen $12,5 \mu\text{C}$ (entsprechend $1,8 \mu\text{g}$ ^3H -Digitoxin).

In bestimmten Zeitabständen (unmittelbar nach Digitoxinzugabe, nach 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168 Stunden) wurden aliquote Teile für die Aktivitätsbestimmung aus dem Innen- und aus dem Außenmedium entnommen. Außerdem erfolgte jeweils eine Entnahme eines Aliquotes aus dem Inhalt des Dialyseschlauches (Innenmedium) zur Proteinbestimmung. Die nach der Messung im Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer erhaltenen Werte in cpm/0,1 ml wurden in μg Digitoxin/ml umgerechnet und auf das gleichzeitig ermittelte Albumin bezogen. Es erfolgte dann die semilogarithmische Auftragung dieser Werte (μg Digitoxin/mg Albumin) gegenüber der Zeit.

B. 1,2 %ige und 9 %ige γ -Globulinlösung

Bei gleicher Versuchsanordnung wie im vorher beschriebenen Versuch wurde jedoch anstatt einer 3 %igen Albuminlösung eine aequimolare γ -Globulinkonzentration (9 %ige Lösung) und eine angenähert physiologische γ -Globulinkonzentration (1,2 %ige Lösung) gewählt. Die Digitoxinkonzentration lag bei diesen Versuchen bei $50 \mu\text{g}/\text{ml}$. Die Radioaktivität betrug ebenfalls $12,5 \mu\text{C}$ (entsprechend $1,8 \mu\text{g}$ ^3H -Digitoxin).

Die Entnahme von Aliquoten aus dem Innen- und Außenmedium erfolgte unmittelbar nach der Digitoxinzugabe, nach 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden. Die Messung der Radioaktivität und die Umrechnung der Werte erfolgte wie schon vorher beschrieben.

12. Bestimmung der Bindungskapazität (= maximales Bindungsvermögen) von Digitoxin an Serumalbumin

Um diejenige Menge an Digitoxin, die maximal am Serumalbumin gebunden werden kann, bestimmen zu können, wurde folgender Versuch durchgeführt: Ansteigende Konzentrationen von Digitoxin wurden 48 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 4° C (Kühlschranktemperatur) in einer 3 %igen Albuminlösung in Sörensenpuffer bei leichtem Schütteln in geschlossenen Röhrchen inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden aus jedem Röhrchen 1,5 ml entnommen und in einen Dialyseschlauch gebracht. Anschließend wurde 48 Stunden bei konstanter Temperatur von 4° C (Kühlschranktemperatur) gegen ein Außenmedium, das bereits die gleiche Digitoxinkonzentration wie das inkubierte Material im Dialyseschlauch enthielt, dialysiert. Am Ende der Dialysezeit wurde jeweils ein Aliquot zur Aktivitätsbestimmung und zur Proteinbestimmung aus dem Innen- und Außenmedium entnommen.

Die Gesamtaktivität im Dialyseschlauch setzt sich aus dem freien, d. h. nicht an das Albumin gebundene Glykosid und dem an das Protein gebundene Glykosid zusammen. Da die Konzentrationen von freiem Digitoxin im Innenmedium den Konzentrationen im Außenmedium am Ende der Dialyse (nach 48 Stunden) gleichzusetzen sind, konnte die an das Albumin gebundene Glykosidmenge errechnet werden (gebundenes Glykosid = Gesamtglykosid innen - freiem Glykosid außen).

Die Werte der entnommenen Aliquote aus dem Inhalt des Dialyseschlauches wurden nach der Bestimmung ihrer Aktivität von cpm/0,1 ml in μ g gebundenes Digitoxin/ml umgerechnet und auf das gleichzeitig ermittelte Gesamteiweiß bezogen. (Angabe in μ g gebundenes Digitoxin/mg Albumin) Anschließend erfolgte die graphische Auftragung der an das Albumin gebundenen Digitoxinmenge gegenüber der freien Glykosidkonzentration außen.

13. Beeinflussung der Bindung von Digitoxin an Serumalbumin durch strukturähnliche Pharmaka (Digoxin, Prednisolon)

Hierbei sollte untersucht werden, ob strukturähnliche Substanzen die Bindungsfähigkeit bzw. Bindungsgeschwindigkeit von Digitoxin an Albumin beeinflussen können. Als strukturähnliche Substanzen wurden wegen ihrer chemischen Verwandtschaft (Steroidabkömmlinge) mit dem Digitoxin Digoxin und Prednisolon gewählt. Eine Versuchsanordnung mit Zusatz von Digoxin zum Digitoxin erschien deshalb sinnvoll, da in der klinischen Therapie häufig ein Wechsel in der Herzglykosidbehandlung vorgenommen wird. Die Prüfung der Affinität unter Zusatz von Prednisolon zum Digitoxin wurde durchgeführt, da bei bestimmten Erkrankungen (z. B. Myocarditis) neben einer Glykosidbehandlung eine Therapie mit Cortisonderivaten erforderlich wird.

Bei gleicher Versuchsanordnung wie im vorangegangenen Versuch (Nr. 11) wurde vor der Dialyse und vor Hinzugabe des Digitoxins ins Außenmedium sowohl das Innen- als auch das Außenmedium mit gleicher Digoxin- bzw. Prednisolonkonzentration (50 µg/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1 Stunde erfolgte die Hinzugabe von Digitoxin in einer Konzentration von 50 µg/ml ins Außenmedium. Die Radioaktivität betrug auch bei diesen Versuchen 12,5 µC (entsprechend 1,8 µg ³H-Digitoxin).

Nach bestimmten Zeitabständen nun (unmittelbar nach der Digitoxinzugabe, nach 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144 und nach 167 Stunden) wurden jeweils Aliquote für die Aktivitätsbestimmung aus dem Innen- und Außenmedium entnommen. Außerdem erfolgte zu jedem Zeitpunkt die Entnahme eines Aliquots aus dem Inhalt des Dialyseschlauches zur Proteinbestimmung. Die nach der Messung im Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer umgerechneten Werte von cpm/0,1 ml in µg Digitoxin pro Gewichtseinheit Albumin wurden semilogarithmisch gegenüber der Zeit aufgetragen.

14. Fehlerbreite der Methodik

Jeder Versuch wurde 2 - 6 mal reproduziert. Die Fehlerbreite der Methodik lag bei $\pm 12\%$ des Mittelwertes der einzelnen Versuchsergebnisse.

IV. Ergebnisse

Nach einer Inkubation von 48 Stunden konnte bei der Papier-elektrophorese im Bereich der Albuminfraktion ein auffälliger doppelgipfliger Aktivitätspeak festgestellt werden. Sowohl an den γ - als auch an den anderen Globulinfraktionen wurde keine Aktivität nachgewiesen. Die fast aequimolare Digitoxin - Digoxininkubation ergab keine bemerkenswerte Herabsetzung des Digitoxinpeaks im Bereich der Albuminfraktion, was für eine Verdrängung des Digitoxins durch das Digoxin gesprochen hätte, wobei hier keine quantitative Angabe gemacht werden kann. Bemerkenswert ist auch die hier festzustellende Peak-Teilung des Radioaktivitätsgehaltes im Bereich der Albuminfraktion (Abb. 2 und 3).

Bei der Prüfung der Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin in γ -Globulinhaltige Medien konnte lediglich ein Konzentrationsausgleich von Digitoxin zwischen dem Innen- und Außenmedium nach 48 Stunden festgestellt werden. Danach blieben die Digitoxinkonzentrationen des Innen- und Außenmediums konstant. Dieser Befund konnte sowohl für die γ -Globulinlösung in angenähert physiologischer Konzentration als auch für eine einer 3 fachen Albuminlösung aequimolaren Konzentration des γ -Globulins erhoben werden. Eine Bindung des Digitoxins an die γ -Globulinfraktion des Serums konnte somit auch mit dieser Versuchsanordnung nicht nachgewiesen werden.

Trägt man das in den Dialyseschlauch eingedrungene, an das Albumin gebundene Glykosid semilogarithmisch in Abhängigkeit von der Zeit auf, so beschreiben die Kurven, die mit unterschiedlichen Glykosidaußenkonzentrationen (5 μ g Digitoxin/ml, 20 μ g Digitoxin/ml und 50 μ g Digitoxin/ml) bestimmt wurden, einen ähnlichen Verlauf.

Die Betrachtung dieser semilogarithmischen Auftragung der Werte der Innenkonzentrationen von Digitoxin ließen die Schlußfolgerung zu, daß die Kurvenverläufe der einzelnen unterschiedlichen Glykosidausgangskonzentrationen eine Exponentialfunktion darstellen könnten. Um diese Behauptung

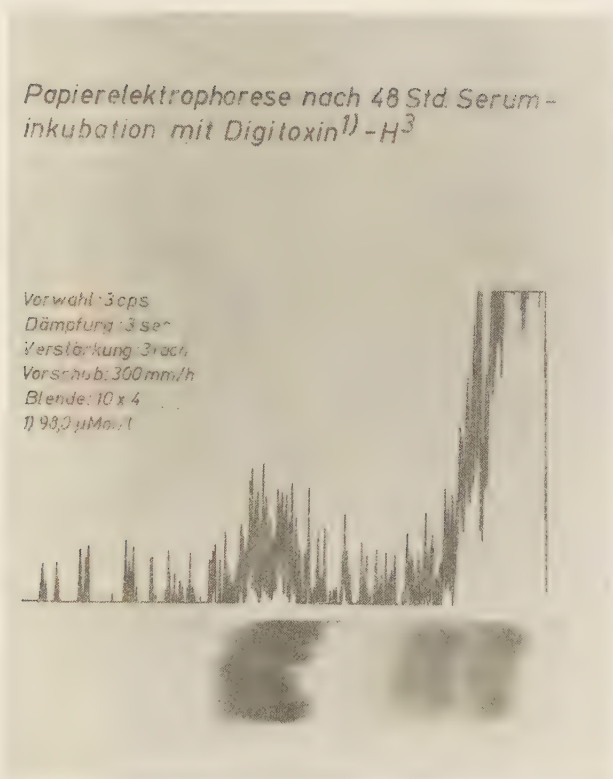


Abb. 2

Nachweis der Bindung von Digitoxin an die Serum-
fraktionen mittels der Papierelektrophorese

*Papierelektrophorese nach 48 Std. Serum-
inkubation mit Digitoxin¹⁾-H³ und Digoxin²⁾*

Vorwahl: 3cps
Dämpfung: 3sec
Verstärkung: 3fach
Vorschub: 300mm/h
Blende: 10x4
1) 98,0 $\mu\text{Mol/l}$
2) 96,0 $\mu\text{Mol/l}$

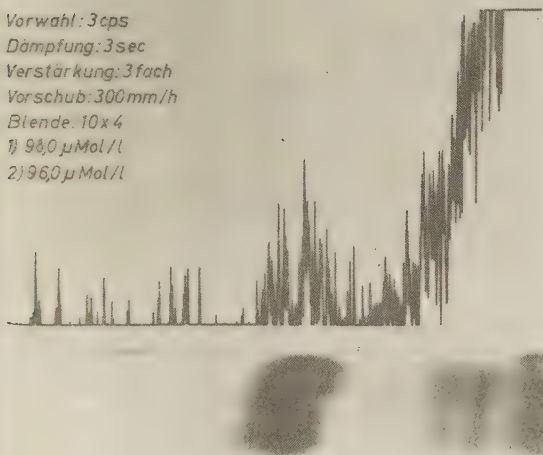


Abb. 3

Nachweis der Bindung von Digitoxin an die Serumfraktionen
nach vorheriger fast aequimolarer Inkubation von Digoxin
mittels der Papierelektrophorese

verifizieren zu können, wurden die Ergebnisse der einzelnen Versuche auf eine Exponential-Funktion 1. Ordnung

$$y(t) = y_{\infty} \left(1 - e^{-\frac{t}{TH} \cdot \ln 2} \right)$$

ausgeglichen.

y_{∞} : diejenige Menge an Digitoxin in μ g pro mg Albumin, die zum Zeitpunkt unendlich maximal in ein eiweißhaltiges Medium einzudringen vermag.

t : Zeitwert der Entnahme der Aliquote in Stunden

TH : HWZ der Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin an Albumin (als Analogon für die Zeitkonstante)

Die nicht bekannten Größen (y_{∞} , TH) der oben genannten Funktion wurden wie folgt ermittelt: y_{∞} mußte abgeschätzt werden, da per definitionem eine genaue Bestimmung nicht möglich ist. Die Differenz von y_{∞} (abgeschätzt) und der bei den Versuchen bestimmten Werte in μ g Digitoxin/mg Albumin wurden semilogarithmisch gegenüber der Zeit aufgetragen. Werden diese Punkte miteinander verbunden, so ergibt sich eine Gerade, aus der die HWZ (TH) errechnet werden konnte. Da die Werte der Differenz zwischen y_{∞} und $y(t)$ bei der semilogarithmischen Auftragung eine Gerade ergaben, konnte somit der abgeschätzte y_{∞} -Wert auf seine Genauigkeit überprüft werden.

Die graphisch ermittelten HWZ betrugen bei einer Außenkonzentration von

5 μ g Digitoxin/ml	94 Stunden
20 μ g Digitoxin/ml	87 Stunden
50 μ g Digitoxin/ml	95 Stunden

Die abgeschätzten y_{∞} -Werte betrugen bei

5 μ g Digitoxin/ml	3,5 μ g Digitoxin/mg Albumin
20 μ g Digitoxin/ml	6,5 μ g Digitoxin/mg Albumin
50 μ g Digitoxin/ml	20,0 μ g Digitoxin/mg Albumin

Die so ermittelten bzw. abgeschätzten Werte wurden in die oben genannte Gleichung eingesetzt. Es ergeben sich also

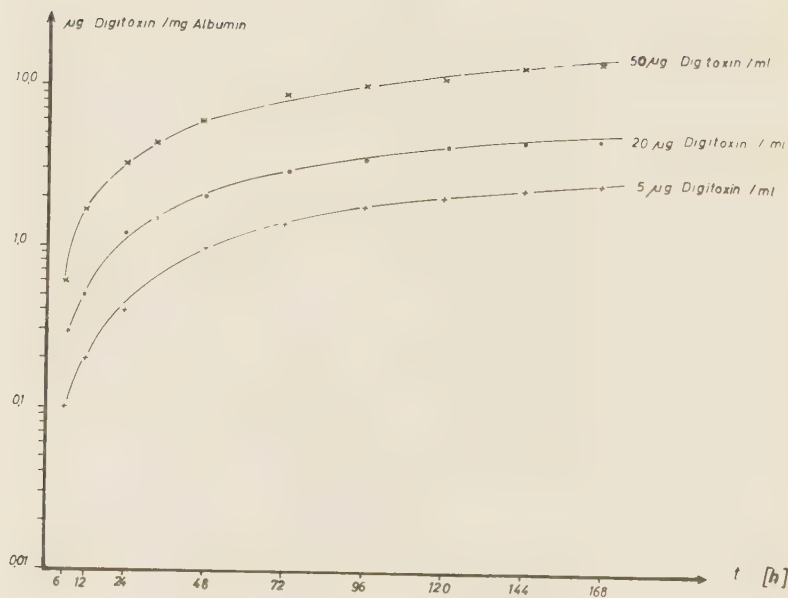


Abb. 4

Versuchsergebnisse der Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin in eine 3 %ige Albuminlösung bei unterschiedlichen Glykosidkonzentrationen

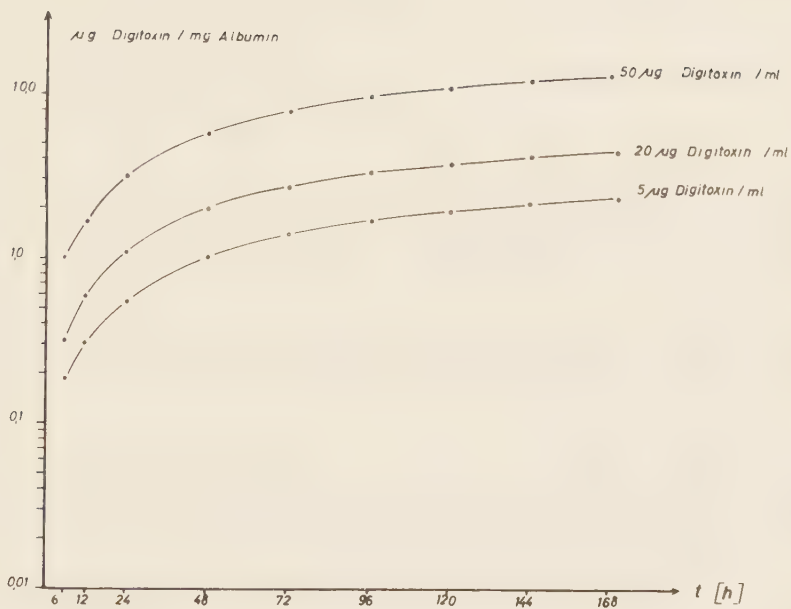


Abb. 5

Errechnete Kurven nach der Gleichung

$$y(t) = y_{\infty} \left(1 - e^{-\frac{t}{TH} \cdot \ln 2} \right)$$

für die Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin in eine 3 %ige Albuminlösung bei unterschiedlichen Glykosidkonzentrationen

für die unterschiedlichen Außenkonzentrationen folgende Annäherungskurven:

$$\text{für } 5 \mu\text{g Digitoxin/ml: } y(t) = 3,5 \left(1 - e^{-\frac{t}{94} \cdot \ln 2} \right)$$

$$20 \mu\text{g Digitoxin/ml: } y(t) = 6,5 \left(1 - e^{-\frac{t}{87} \cdot \ln 2} \right)$$

$$50 \mu\text{g Digitoxin/ml: } y(t) = 20,0 \left(1 - e^{-\frac{t}{95} \cdot \ln 2} \right)$$

Daraus konnten dann für die einzelnen Kurven die zugehörigen Punkte $[y(t)]$ errechnet werden. Die so bestimmten Werte wurden wiederum semilogarithmisch gegenüber der Zeit aufgetragen.

Der Vergleich der mathematisch errechneten Exponentialfunktionen mit den bei den Versuchen erhaltenen Kurven zeigt eine gute Übereinstimmung (Abb. 4 und 5).

Die graphische Auftragung der an das Albumin gebundenen Digitoxinmenge gegenüber der freien Glykosidkonzentration außen zeigte eine stetige Zunahme des gebundenen Glykosidanteils bei niedrigen freien Digitoxinkonzentrationen. Ab einer Konzentration des freien Glykosids von $40 \mu\text{g/ml}$ blieb die an das Albumin gebundene Glykosidmenge annähernd konstant. Da auch die höheren Konzentrationen von freiem Digitoxin ($80 \mu\text{g pro ml}$, $90 \mu\text{g/ml}$ und $100 \mu\text{g/ml}$) keine Zunahme des an Albumin gebundenen Digitoxins erbrachten, läßt sich daraus der Schluß ziehen, daß bereits bei einer Konzentration von $40 \mu\text{g freien Glykosids/ml}$ die Bindungskapazität des Albumins für Digitoxin erreicht wurde.

Bei dieser Versuchsanordnung wurde die Bindungskapazität (= maximales Bindungsvermögen) von Digitoxin an Albumin mit einem Wert von $8,5 \mu\text{g gebundenes Digitoxin pro mg Albumin}$ ermittelt (Abb. 6)

Die Betrachtung der Kurvenverläufe von Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g pro ml}$ nach Inkubation von Digoxin bzw. Prednisolon legte den Schluß nahe, daß es sich auch hierbei um e-Funktionen handeln könnte (Abb. 7 und 8).

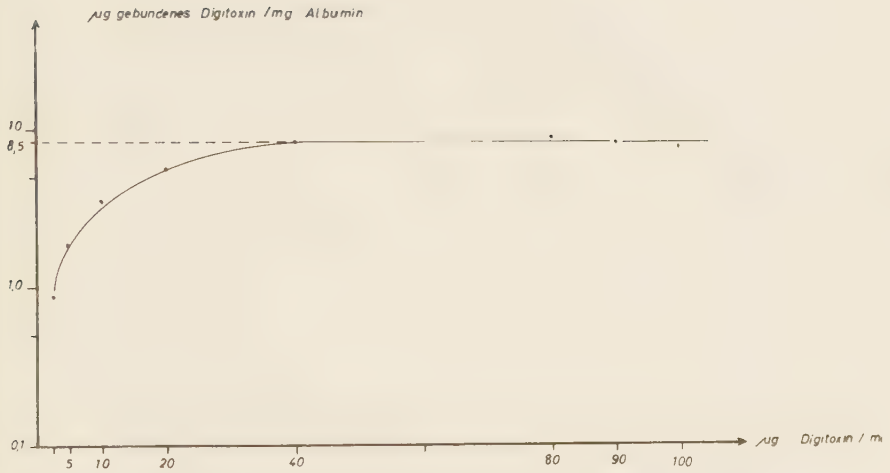


Abb. 6

Bestimmung der Bindungskapazität (= maximales Bindungsvermögen) von Digitoxin an Serumalbumin

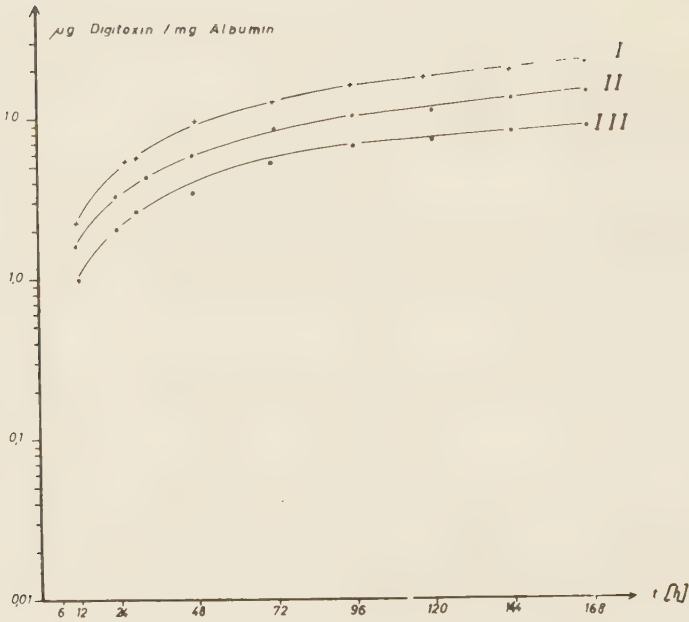


Abb. 7

Versuchsergebnisse zur Beeinflussung der Bindung von Digitoxin durch strukturähnliche Pharmaka (Digoxin, Prednisolon)

- I Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ nach vorheriger Inkubation mit $50 \mu\text{g}$ Prednisolon/ml
- II Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$
- III Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ nach vorheriger Inkubation von $50 \mu\text{g}$ Digoxin/ml

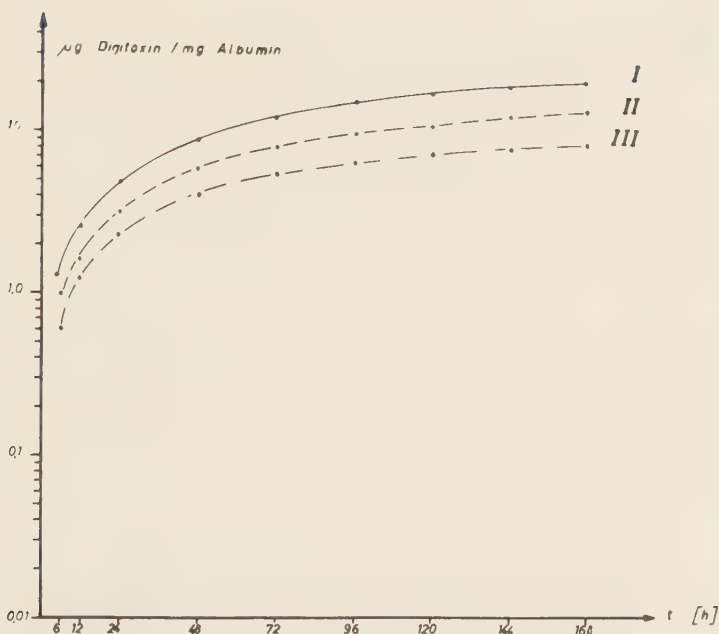


Abb. 8

Errechnete Kurven nach der Gleichung

$$y(t) = y_{\infty} \left(1 - e^{-\frac{t}{TH} \cdot \ln 2} \right)$$

für die Beeinflussung der Bindung von Digitoxin durch strukturähnliche Pharmaka (Digoxin, Prednisolon)

- I Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ nach vorheriger Inkubation von $50 \mu\text{g}$ Prednisolon/ml
- II Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$
- III Digitoxin in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ nach vorheriger Inkubation von $50 \mu\text{g}$ Digoxin/ml

Bei der Berechnung der Annäherungskurve

$$y(t) = y_{\infty} \left(1 - e^{-\frac{t}{T_H} \cdot \ln 2} \right)$$

wurde wie im vorangegangenen Versuch vorgegangen. Die unter Digoxininkubation errechneten Werte lagen für y_{∞} bei 10,5 μ g Digitoxin/mg Albumin und für T_H bei 67 Stunden, so daß sich folgende Gleichung ergibt:

$$y(t) = 10,5 \left(1 - e^{-\frac{t}{67} \cdot \ln 2} \right)$$

Die unter Zusatz von Prednisolon zum Digitoxin errechneten Werte lagen für y_{∞} bei 30 μ g Digitoxin/mg Albumin und für T_H bei 91,5 Stunden, so daß folgende Gleichung aufgestellt werden kann:

$$y(t) = 30 \left(1 - e^{-\frac{t}{91,6} \cdot \ln 2} \right)$$

Die Kurvenverläufe von Digitoxin in einer Konzentration von 50 μ g pro ml bei gleichzeitiger Anwesenheit von 50 μ g Digoxin/ml lag unter der entsprechenden Kurve von Digitoxin ohne Zusatz von Digoxin. Diese Tatsache läßt die Schlußfolgerung zu, daß das Digoxin das Bindungsvermögen für Digitoxin an das Albumin herabsetzt.

Im Gegensatz dazu lag die Kurve von Digitoxin in einer Konzentration von 50 μ g/ml bei gleichzeitiger Anwesenheit von 50 μ g Prednisolon/ml in einem höheren Bereich als die entsprechende Kurve von Digitoxin ohne Zusatz von Prednisolon.

V. Diskussion

Unsere papierelektrophoretischen Untersuchungen zeigen, daß die Eiweißbindung von Digitoxin nur an die Albuminfraktion des Humanserums erfolgt. Weiter ergibt sich der Hinweis, daß sich die Bindung nicht auf alle Albumine gleichmäßig erstreckt. Auch mit dem Dialyseverfahren können wir eine Bindung von Digitoxin an die γ -Globuline, wie sie 1958 von SPRATT und OKITA (75) angegeben wurde, nicht bestätigen. Unsere Untersuchungen stimmen mit den Ergebnissen von HAARMANN, HAGEMIER und LENDL (26, 27) 1940 überein, die eine Eiweißbindung von Digitoxin nur an die Albuminfraktion des Serums fanden. SCHOLTAN (67) stellte 1966 bei seinen Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge fest, daß unverdünntes Humanserum mit einem Eiweißgehalt von 7,7 g pro 100 ml im Vergleich zu einer 4 %igen Humanalbuminlösung keine unterschiedliche Eiweißbindung für Digitoxin aufwies. Die gleichen Befunde konnte er bei Seren mit einem Eiweißgehalt von 1,9 g/100 ml im Vergleich zu einer 1 %igen Humanalbuminlösung erheben. Allerdings stellte er eine geringe Eiweißbindung von Digitoxin an die γ -Globulinfraktion bei einer 3 %igen Glykosidkonzentration fest. Bei unseren Versuchen können wir auch bei unphysiologisch hohen γ -Globulinkonzentrationen keine Bindung von Digitoxin nachweisen.

Als zweites Kriterium für die Eiweißbindung des Digitoxins wurde die Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin in ein eiweißhaltiges Medium bei unterschiedlichen Glykosidkonzentrationen untersucht. Dabei zeigen die graphischen Darstellungen der einzelnen Versuche einen ähnlichen Verlauf. Da in den Ausführungen von RUIZ-TORRES (64) 1965 über die Bindung von Sulfonamiden an Serumeiweiß bei der Penetrationsgeschwindigkeit eine Abgleichung durch eine e-Funktion vorgenommen wurde, lag der Schluß nahe, dies analog für die unterschiedlichen Digitoxinausgangskonzentrationen nachzuvollziehen. Dabei konnte eine gute Übereinstimmung der

bestimmten Werte mit den errechneten Kurvenverläufen erzielt werden. Auffällig war hierbei jedoch, daß die Kurvenverläufe ihren asymptotischen Verlauf erst zu einem bedeutend späteren Zeitpunkt erreichten als diejenigen von anderen Pharmaka z. B. Sulfonamide, RUIZ-TORRES (1965). Wesentliche Determinanten für diese e-Funktionen stellen einerseits die Diffusionsgeschwindigkeit des Pharmakons durch eine semipermeable Wand und andererseits seine Eiweißaffinität dar. Da die Diffusionsgeschwindigkeit von Digitoxin gegenüber anderen Substanzen z. B. Sulfonamide, RUIZ-TORRES (1965) verlangsamt ist, muß die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen dem Innen- und Außenmedium ebenfalls verzögert sein. Es ist daher anzunehmen, daß daraus eine langsamere Bindung von Digitoxin an das Serumalbumin resultiert. Inwieweit zusätzlich die verzögerte Bindung durch eine verminderte Affinität des Humanalbumins zum Digitoxin hervorgerufen wird, bleibt zu diskutieren.

Wegen der langsamen Diffusionsgeschwindigkeit des Digitoxins erfordert die Dialysemethode einen relativ großen zeitlichen Aufwand. Möglicherweise liegt hierin auch ein Grund, daß andere Autoren (Scholtan u. a.) die Methode der Ultrazentrifugation bevorzugen. Eine Adsorption des Glykosids an die semipermeable Wand, wie sie von SCHOLTAN et al. (70) 1966 angegeben wurde, kann bei unseren Versuchen ausgeschlossen werden. Der Wert der Dialysemethode gegenüber anderen Versuchsmethoden liegt in ihrem einfachen technischen Aufwand.

Bei Zusatz von Digoxin in äquimolarer Konzentration zum Digitoxin fand elektrophoretisch keine augenfällige Verdrängung des Digitoxins aus seiner Bindung an die Albumine statt. Dieser Befund spricht für eine stärkere Bindungsfähigkeit der Albumine für Digitoxin. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen von SCHOLTAN (70) 1966 gestützt, der eine Abschwächung der Eiweißbindung von Pharmaka durch die Einführung von Hydroxyl-Gruppen feststellte.

Die Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin nach vorheriger Inkubation von Digoxin bzw. Prednisolon in gleicher Konzentration zeigt, daß die Kurvenverläufe ebenfalls einer errechneten Exponentialfunktion 1. Ordnung zuzuordnen sind. Die bestimmten Werte lagen bei Prednisolon gering oberhalb der Werte ohne vorheriger Inkubation. Dieser Befund könnte durch eine Verschiebung des Donnan-Gleichgewichtes durch die Prednisolonkonzentrationen im Innen- und Außenmedium bedingt sein, die eine höhere Penetrationsgeschwindigkeit des Digitoxins hervorrufen könnte. Daraus würde ein vermehrtes Eindringen von freiem Digitoxin ins Innenmedium resultieren und dadurch eine höhere Glykosidaufnahme der Albumine erscheinen lassen. Andererseits bleibt zu diskutieren, ob Prednisolon durch noch unbekannte Mechanismen die Affinität des Digitoxins zum Albumin erhöht.

Nach vorheriger Inkubation von Digoxin lagen die Werte für Digitoxin stets unter den Werten ohne vorheriger Inkubation. Hierbei dürfte es sich um eine Verdrängung des Digitoxins aus seiner Eiweißbindung durch das Digoxin handeln (konkurrierende Bindung). Diese Annahme wird durch die Befunde von ROTHLIN et al. (zit.nach 62) gestützt, die eine geringgradige Digoxinbindung an die Albumine nachweisen konnten.

ROTHLIN und KALLENBERGER (zit. nach 62) konnten 1950 bei ihren Untersuchungen am isolierten Froschherzen nachweisen, daß Humanalbumin etwa $2,2 \mu\text{g}$ Digitoxin/mg Protein zu binden vermag. Dieser Wert liegt eindeutig unter dem von uns bestimmten maximalen Bindungsvermögen von Digitoxin an Humanalbumin. Die Ursache hierfür könnte in der von ihnen gewählten unphysiologisch niedrigen Proteinkonzentration (1 %iges Humanalbumin) liegen. SPRATT und OKITA (75) gaben 1948 eine Bindungskapazität des Rattenserums mit $0,01 \mu\text{g}$ Digitoxin/mg Protein an. Dieser Wert liegt ebenfalls unter der von uns bestimmten Größe. Sie arbeiteten allerdings im "therapeutischen Bereich". Andererseits verwandten sie für ihre Versuche Ratten, die bekannter Weise gegenüber Herzglykosiden unempfindlich sind. Außerdem wäre noch zu

diskutieren, ob Rattenalbumin ein geringeres Bindungsvermögen für Digitoxin besitzt. HAARMANN, HAGEMEI^{ER} und LENDL (26, 27) konnten 1940 bei ihren Dialyseversuchen ein erreichbares maximales Bindungsvermögen für Digitoxin mit 9 mg/g Albumin angeben. Sie wählten für ihre Untersuchungen eine Proteinkonzentration von ca. 1 g/100 ml. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die Bindungskapazität (= maximales Bindungsvermögen) des Humanalbumins für Digitoxin mit einem Wert von $8,5 \mu\text{g/mg}$ Albumin bestimmt. Die jetzigen Untersuchungen wurden in angenähert physiologischem Milieu vorgenommen. Es konnte also eine gute Übereinstimmung zwischen der damals nur auf rechnerischem Weg ermittelten Größe der Bindungskapazität und den jetzigen Untersuchungen gefunden werden.

Ausgehend von dem maximalen Bindungsvermögen des Humanalbumins für Digitoxin von $8,5 \mu\text{g/mg}$ Albumin ergibt die maximale Absättigung des Gesamtalbumins des menschlichen Körpers (im menschlichen Blut sind ca. 250 g Albumin enthalten) einen theoretischen Wert von 2025,0 mg. Daraus ist deutlich zu ersehen, daß die in der täglichen Praxis verabreichten Dosen weit unter der in vitro bestimmten Bindungskapazität liegen. Der vielfach in der Klinik gebrauchte Begriff der Sättigung mit Herzglykosiden ist also eindeutig von dem in vitro bestimmten maximalen Bindungsvermögen für Digitoxin an Albumin zu trennen.

Denn bei der Betrachtung von biologischen Vorgängen ist nicht nur die Bindung eines Pharmakons an bestimmte Eiweißkörper für ihre Wirksamkeit ausschlaggebend. Neben dieser Bindung ist nämlich die Affinität dieses Stoffes für das Gewebe bzw. Interstitium und die daraufhin aufgetretene Gleichgewichtseinstellung zu berücksichtigen. Das Zusammenwirken dieser Faktoren bestimmten in Abhängigkeit der Metabolisierungsrate die Wirkdauer des betreffenden Stoffes. Die hohe Eiweißbindungsaffinität des Albumins für Digitoxin, die größer ist als für Digoxin, dürfte auch der Grund für die klinische Wirkzeit im Organismus sein. Die unterschiedliche Wirkungsdauer der einzelnen Glykoside wird wahrscheinlich hauptsächlich durch ihre differente Eiweißbindungsfähigkeit bedingt sein. Diese wiederum wird durch die chemische Konstitution der einzelnen Glykoside hervorgerufen.

VI. Zusammenfassung

Bei den Untersuchungen zur Charakterisierung der Bindung von Digitoxin an die Eiweißkörper des menschlichen Serums konnten folgende Befunde erhoben werden:

1. Mit Papierelektrophoresen, die sowohl für die Färbung als auch für den Aktivitätsnachweis des radioaktiven Digitoxins im Dünnschicht-Scanner verwandt wurden, konnte eine alleinige Bindung des Digitoxins an die Albuminfraktion des Humanserums nachgewiesen werden.
2. Bei der Prüfung der Penetrationsgeschwindigkeit von Digitoxin konnte eine Bindung an die γ -Globulinfraktion - auch in unphysiologisch hohen Konzentrationen - nicht beobachtet werden.
3. Als Kriterium für die Affinität von Digitoxin an die Albumine des menschlichen Serums wurde die Penetrationsgeschwindigkeit in ein eiweißhaltiges Medium angenommen. Hierbei fand sich, daß sich diese Geschwindigkeit von Digitoxin auf eine Exponentialfunktion des Typs

$$y(t) = y_{\infty} \left(1 - e^{-\frac{t}{TH} \cdot \ln 2} \right)$$

ausgleichen läßt.

4. Das maximale Bindungsvermögen (= Bindungskapazität) von Albumin für Digitoxin wurde durch die Gleichgewichtsdialyse bestimmt. Der Wert für diese Bindungskapazität lag bei $8,5 \mu\text{g}$ gebundenes Digitoxin/mg Albumin.
5. Während Prednisolon die Bindungsfähigkeit des Digitoxins zum Albumin heraufsetzt, setzt sie Digoxin herab.

VII. Literaturverzeichnis

1. ACHELIS, J. D., KRONEBERG, G.: Kumulation und Wirkungsdauer von Digitalisglykosiden.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 236,
234 (1959)
2. ALBRIGHT, E. C., DEISS, W. P., LARSON, F. C.: Radiochromatographic identification of thyroxin in an alpha globulin fraction of serum separated by starch zone electrophoresis.
J. Lab. Clin. Med. 42, 777 (1953)
3. AWAI, M., BROWN, E. B.: Studies of the metabolism of ¹³¹I-labeled human transferrin.
J. Lab. Clin. Med. 61, 363 (1963)
4. BRAUNWALD, M.: Digitalis
Ann. Rev. Med. 16, 371 (1965)
5. BAUER, H.: Zur Kenntnis der Ursachen der Kumulationserscheinungen der Digitalisglykoside.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 176, 74 (1934)
6. BENNHOLD, H., KYLIN, E., RUSZNYAK, S.: Die Eiweißkörper des Blutplasmas.
Verlag Th. Steinkopff, Dresden 1938
7. BENNHOLD, H.: Blutkreislauf und Transportvorgänge im menschlichen Körper.
Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte 1963
8. BENNHOLD, H., OTT, H., WIECH, M.: Über den Bindungsunterschied lebergängiger und nierengängiger Substanzen an die Serumeiweißkörper.
Dtsch. med. Wschr. 11, 1 (1950)
9. BENNHOLD, H.: Die Serumelektrophorese in Klinik und Forschung: Möglichkeiten und Ausblicke.
Med. Klin. 1, 8 (1954)

10. BENTHE, H. F., CHENPANICH, K.: Vergleich der enteralen Wirksamkeit von Digoxin, Acetyldigoxin und Digitoxin.
Arzneimittelforschung 15, 486 (1965)
11. BINE, R., FRIEDMAN, M.: Observations concerning the effects of blood upon the action of a digitalis glykoside.
Amer. J. med. Sci. 534 (Nov. 1948)
12. BINE, R., FRIEDMAN, M.: The rate of disappearance of lanatoside C and digitoxin from the blood of rats.
Circulation (New York) 4, 105 (1951)
13. BRÜCKE, F. TH.: Über die Beeinflussung der Digitoxinwirkung durch Serum.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 175, 92 (1934)
14. BUSCK, G.: Die photobiologischen Sensibilatoren und ihre Eiweißverbindungen.
Biochem. Z. 1, 425 (1906)
15. CLOETTA, M., FISCHER, H. F.: Über das Verhalten des Digitoxins im Organismus.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 54, 261 (1906)
16. DOHERTY, J. E., PERKINS, W. H., WILSON, M. C.: Studies with tritiated digoxin in renal failure.
Amer. J. Med. 37, 536 (1964)
17. DYBING, O., HOLZHAUSEN, H. C.: Über die Bindung von Digitalisstoffen an die Eiweißfraktionen von Herz- und Skelettmuskel.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 194, 248 (1940)
18. FAWAZ, G., FARAH, A.: A study of the digitoxin binding power of serum and other soluble tissue-proteins of the rabbit.
J. Pharmacol. 80, 193 (1944)
19. FARAH, A.: On the combination of some cardioactive glykosides with serum proteins.
J. Pharmakol. 83, 143 (1945)

20. FISCHER, H.: Über Aufnahme, Bindung und Abbau von Digitalisstoffen und der daraus sich ergebenden Beziehungen zu ihrer Wirkung am Herzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path.
130, 111 (1928)
21. GIERTZ, H., HAHN, F., SCHUNK, R.: Über die Bindung und Elimination von Herzglykosiden in der Leber und Niere vom Meerschweinchen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path.
221, 34 (1954)
22. GOLD, H.: Digitaliselimination (pharmakokinetische Ergebnisse der Glykosidwirkung)
Arch. Int. Med. 32, 779 (1923)
23. GOLGSTEIN, A.: Drug - Protein - Interaction.
J. Pharmacol. exp. Ther. 95, 102 (1949)
24. GREEF, K.: Zur Pharmakologie herzwirksamen Glykoside.
Klin. Physiologie I, Thieme Verlag 340 (1963)
25. GUGGENHEIM, M., FROMMHERZ, K., KARRER, W.: Die Glykosidfraktionen der Digitalisblätter.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path.
165, 412 (1932)
26. HAARMANN, W., HAGEMEIERS, A., LENDL, L.: Über die Bindung von Digitalisglykosiden und Digitaloiden an die Eiweißstoffe des Blutserums.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path.
194, 205 (1940)
27. HAARMANN, W., KORFMACHER, K., LENDL, L.: Bedingungen der Bindung von Digitalisglykosiden an die Serumeiweißstoffe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path.
194, 229 (1940)
28. HÖEKSTRA, R. A.: Das Verhalten von Digitalisglykosiden in Blut und Gewebsflüssigkeit.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path.
162, 649 (1931)

29. HOEKSTRA, R. A.: Die Zusammensetzungen der galenischen Präparate aus dem Blattpulver von *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 163, 1 (1932)
30. HOFMANN, P., KRIEGLSTEIN, J., MUTSCHLER, E., WOLLERT, U.: Die Bestimmung der Eiweißbindung einiger Guanylhydrazone mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration.
Arzneimittelforschung 5, 681 (1970)
31. KERP, L., KASEMIR, H., NESSLER, G.: Komplexbildung biogener Amine mit Serumalbumin in Korrelation zur Hemmwirkung von Albumin im biologischen Test.
Klin. Wschr. 39, 917 (1961)
32. KOMIJAMA, T.: Untersuchungen zur Physiologie und Pharmakologie des pH am Herzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 139, 100 (1929)
33. KRIEGLSTEIN, J., KUSCHINSKY, G.: Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka durch Gelfiltration.
Arzneimittelforschung 18, 287 (1968)
34. KUSCHINSKY, K.: Bestimmung der Eiweißbindung verschiedener Herzglykoside mittels Sephadex-Gelfiltration.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 259, 394 (1968)
35. KUTZIM, H.: Bluteiweißkörper und Antibiotica bei der Papierelektrophorese.
Klin. Wschr. 35/36, 852 (1952)
36. LAUTERBACH, F., VOGEL, G., NITZ, D., ROTT, G., TERVOOREN, U.: Zur Abhängigkeit der renalen Wirkung des Digitoxins von seiner Verteilung zwischen Plasmaalbumin und Nierengewebe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 249, 374 (1964)
37. LHOTAK VON LHOTA, C.: Untersuchungen über das Verhalten der Digitalisstoffe im Körper besonders bei der Angewöhnung an dieselben.
Arch. int. de Pharmacod. 22, 61 (1912)

38. LHOTAK VON LHOTA, C.: Versuche über die Fixation des Digitoxins im Organismus des Kaninchens nach intravenöser Injektion nebst vergleichenden Versuchen mit Strophantigin.
Biochem. Z. 48, 144 (1913)
39. LENDL, L., PUSCH, F.: Über die Bindung der Digitaliskörper an die Eiweißstoffe des Blutes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. exp. Path. 177, 550 (1935)
40. LOWENSTEIN, J.: A method for measuring plasma levels of Digitalis glykosides.
Circulation 31, 228 (1965)
41. MALAMOS, B., MOULOPOULOS, S., KOSTAMIS, P., BALKOURA, M., BINOPOULOS, D.: Eine neue Isotopenmethode zur Bestimmung der Digitalisglykoside im Serum.
Münch. Med. Wschr. 107, 1486 (1965)
- 41a MALAMOS, B., MOULOPOULOS, S., KOSTAMIS, P., BALKOURA, M., ANDREPOULOS, A., BINOPOULOS, D.: The effect of Digitalisation on the disappearance rate of tritiated Digoxin from blood.
Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung VI, 310 (1964), Urban und Schwarzenberg.
42. MC LEAN, F. G., HASTINGS, A.: A biological method for the estimation of calcium ion concentration.
J. biol. Chem. 107, 337 (1934)
43. MC LEAN, F. G., HASTINGS, A.: The state of calcium in the fluids of the body.
J. biol. Chem. 108, 285 (1935)
44. MEYER, C. J., LAYNE, D. S., TAIT, J. F., PINCUS, G.: The binding of aldosterone to plasma proteins in normal, pregnant and steroidtreated woman.
J. Clin. Invest. 40, 1663 (1961)
45. MICHAELIS, L., RONA, P.: Die Methode der osmotischen Kompensation.
Biochem. Z. 14, 476 (1908)

46. MILLS, I. H.: Protein - binding of cortisol.
J. Endocrinol. 27 (1963)
47. OEFF, K., RUST, S., SCHWARZ, E., WEISE, H. J.: Zur Frage der Bindung von Penicillin an Serumweißkörper.
Klin. Wschr. 17/18, 419 (1955)
48. OPPENHEIMER, E.: Zur Frage der Fixation der Digitaliskörper im tierischen Organismus und besonders deren Verhalten zum Blut.
Biochem. Z. 55, 134 (1913)
49. PEARSON, H. A., VERTREES, K. N.: Studies on the binding of chromium⁵¹ to hemoglobin.
Blood 17, 373 (1961)
50. PUSCH, F.: Über das adsorptive Verhalten von Digitaliskörpern und Strophantin an verschiedenen Substanzen mit und ohne Zusatz von Eiweißkörpern.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 177, 564 (1935)
51. PUTNAM, F. W.: The Plasma Proteins.
Academic Press, New York and London 1960
52. RAPOPORT, S. M.: Medizinische Biochemie Berlin VEB Verlag Volk und Gesundheit 1969
53. REMMER, H.: Zur Bedeutung der Eiweißvehikelfunktion.
Arzneimittelforschung 18, 1467 (1968)
54. REPKE, K.: Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei der Ratte.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 233, 271 (1958)
55. REPKE, K.: Die chemische Bestimmung von Digitoxin in Geweben und Ausscheidungen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 233, 261 (1958)
56. REPKE, K.: Über Beziehungen zwischen Stoffwechsel und Kumulation von Herzglykosiden.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 236, 242 (1959)

57. REPKE, K.: Über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis.
Klin. Wschr. 42, 157 (1964)
58. RESCIGNO, A., SEGRE, G.: la cinetica dei Farmaci e dei traccianti radioattivi.
Paolo Boringlieri 1961 Torino
59. ROTHLIN, E.: Das Blut und seine Funktion für den Transport und die Verteilung von Wirkstoffen.
Vierteljahresschrift Naturforsch. Ges. Zürich 90, 195 (1945)
60. ROTHLIN, E.: Über die Glykosidbindung durch die Bluteiweißkörper bei der Katze.
Helvet. physiolog. Acta 3, C 13 (1945)
61. ROTHLIN, E., al.: Über das Glykosidbindungsvermögen verschiedener Eiweißfraktionen des Blutes.
Arch. int. Pharmacodyn. 81, 520 (1950)
62. ROTHLIN, E., BIRCHNER, R.: Pharmakodynamische Grundlagen der Therapie mit herzwirksamen Glykosiden.
Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde V, 457 (1954)
63. RUIZ-TORRES, A., OHLMEIER, J.: Die Digoxin-Resorption an der perfundierten Dünndarmschlinge der Ratte.
Arzneimittelforschung 4, 522 (1970)
64. RUIZ-TORRES, A., MEINIG, K.-H.: Die Bindung von Sulfonamid an Serumeiweiß.
Arzneimittelforschung 15, 443 (1965)
65. SCHATZ, D. L., OSORIO, C.: Determination of the binding capacity of corticosteroid binding protein.
J. Endocrinol. VI 27 (1963)
66. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Langzeit-Sulfonamide an die Eiweißkörper des Serums.
Arzneimittelforschung 8, 707 (1961)
67. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Antibiotica an die Eiweißkörper des Serums.
Arzneimittelforschung 5, 347 (1963)

68. SCHOLTAN, W.: Vergleichende quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Chemotherapeutica mittels Sephadex und Dialyse.
Arzneimittelforschung 14, 146 (1964)
69. SCHOLTAN, W.: Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und RNS.
Arzneimittelforschung 18, 505 (1968)
70. SCHOLTAN, W., SCHLOSSMANN, K., ROSENKRANZ, H.: Bestimmung der Eiweißbindung von Digitalispräparaten mittels der Ultrazentrifuge.
Arzneimittelforschung 16, 109 (1966)
71. SCHOLTAN, W., SCHLOSSMANN, K., ROSENKRANZ, H.: Die Bindung von Steroidhormonen und von Steroidguanylhydrazonen an Serumalbumin.
Arzneimittelforschung 18, 767 (1968)
72. SCHOLTAN, W., SCHMID, J.: Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und des Gewebes.
Arzneimittelforschung 12, 741 (1962)
73. SCHUBERT, R.: Die Anwendung von Periston N zur Serum- und Zellwäsche und ihre klinische Bedeutung.
Dtsch. med. Wschr. 47, 1487 (1951)
74. SLAUNWITHE, J., ROSENTHAL, H., SANDBERG, A.: Interactions of steroids with human plasma proteins.
Arch. Biochem. Biophys. 100, 486 (1963)
75. SPRATT, J. L., OKITA, G. T.: Protein binding of radioactive digitoxin.
J. Pharmacol. exp. Ther. 124, 109 (1958)
76. STORM VAN LEEUWEN, W.: On the influence of colloids on the action of noncolloidal drugs.
J. Pharmacol. exp. Ther. 17, 1 (1921)
77. SUTER, E.: Über die Bindung herzwirksamer Glykoside im Blutserum.
Helvet. physiolog. Acta 2, 211 (1944)
78. TUBA, F., SCHOLTISSEK, Z.: Untersuchungen mit ^{14}C markierten Digitalis-Stoffen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path.
222, 206 (1954)

79. WAGLE, S. R.: The influence of growth hormone, cortisol and insulin on the incorporation of amino acids into protein.
Arch. Biochem. Biophys. 102, 373 (1963)
80. WERSCHININ, N.: Zur Kenntnis der diastolischen Herzwirkung der Digitalingruppe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 60, 328 (1909)
81. WERSCHININ, N.: Über die systolische und diastolische Herzwirkung des g-Strophanthins.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 63, 386 (1910)
82. YERNAUX, N.: Sur le mécanisme de l'intoxication digitalique.
Arch. int. Pharmacod. Ther. 18, 117 (1908)

Herrn Professor Dr. med. A. RUIZ-TORRES danke ich sehr für die Überlassung des Dissertationsthemas. Seine Anregungen, Anleitungen und stete Bereitschaft zur Diskussion halfen mir, theoretische und praktische Schwierigkeiten zu überwinden.

Herrn Professor Dr. J. HORNUNG, Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation im Klinikum Steglitz, möchte ich für die Unterstützung bei der Lösung mathematischer Fragen danken.

Lebenslauf

Ich, Sabine Carola Krebs, geb. Kropp, wurde am 26.9.1943 als Tochter des jetzigen Präsidenten des wissenschaftlichen Landesprüfungsamtes Berlin Prof. Dr. Gerhard Kropp und seiner Ehefrau, der med. techn. Assistentin Irma Kropp, geb. Will, in Frankfurt/O geboren. Nach der Flucht aus Waldsiedersdorf wurde ich 1949 in die Evangelische Einheitsschule in Berlin-Steglitz eingeschult. Nach einer 4jährigen Grundschulzeit habe ich das humanistische Gymnasium zu Berlin-Steglitz besucht. Am 4.3.1963 habe ich dort meine Reifeprüfung abgelegt. Seit dem SS 1963 studierte ich Medizin an der Freien Universität Berlin. Am 11.2.1969 habe ich vor dem dortigen Prüfungsausschuß mein Staatsexamen mit "gut" abgelegt. Meine Medizinalassistentenzeit habe ich an der Dermatologischen Universitätsklinik, der Universitätsfrauenklinik, der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Westend und an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin absolviert. Meine Approbation habe ich am 1.6.1970 erhalten. Zur Zeit bin ich am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin als wissenschaftliche Assistentin tätig.

Am 30.4.1969 habe ich den Arzt Dr. med. Friedrich-Alexander Krebs geheiratet.

